

厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業、H26-化学-一般-001）
化学物質の経気道暴露による毒性評価の迅速化、定量化、高精度化に関する研究
－ シックハウス症候群を考慮した不定愁訴の分子実態の把握と
情動認知行動影響を包含する新評価体系の確立－（H26-化学-一般-001）

平成 26 年度～28 年度 総合研究報告書
分担研究報告書

研究分担課題：「シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露実験の実施」

研究分担者	北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	小川幸男	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	高橋祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	森田紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	古川佑介	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	大西 誠	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部
	梅田ゆみ	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部
	相磯成敏	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部

研究要旨

実験動物による吸入毒性試験において病理組織学的な病変を誘発する暴露濃度は、人のシックハウス症候群（SH）の指針濃度をはるかに超える濃度であることから、そこから得た毒性情報を人へ外挿することの困難さが指摘されてきた。これに対し、先行研究では平成 14 年「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる物質をその指針値レベルでマウスに反復吸入暴露（7日間）し、病理組織所見が得られない段階での遺伝子発現変動を PerceIome トキシコゲノミクス法により測定し、肺、肝において化学物質固有及び共通のプロファイルを網羅的に捕えた。加えて、海馬に対し化学構造の異なる 3 物質が共通して神経活動抑制を示唆する遺伝子発現変化を誘発したことから、これが人の SH における「不定愁訴」の原因解明の手がかりとなる可能性が示された。

本研究は、反復暴露の結果の検証とその判定根拠の一般化を目指し、SHレベルでの単回暴露実験を実施し、同一個体の海馬、肺、肝の遺伝子発現変動を解析し海馬神経活動抑制の上流に位置する分子機序と肺・肝の関与の解明、情動認知行動解析と海馬における神経科学的物証の収集による中枢に対する有害性の実証データと、遺伝子発現変動データの突合による、遺伝子発現情報からの中枢影響に関する予見性の確認、を目的とする。この際、脳が高感受性期にある子どもの特性に配慮した幼児期暴露 - 遅発性影響も検討する。加えて、ヒト気道上皮細胞系を用いた *in vitro* 解析系の構築を実施し、ヒトへの外挿性の向上を計る

本分担研究では、雄性マウスを対象とした極低濃度吸入暴露実験を、第一の目的に向けて、先行研究での暴露条件である 2 時間単回暴露のプロトコールにより、また第二の目的に向けて、先行研究での暴露条件である 22 時間/日×7 日間反復暴露のプロトコールにより実施する。

平成 26 年度はキシレン（指針値：0.2 ppm）及びパラジクロロベンゼン（指針値：0.04 ppm）について目標通りに極低濃度下（キシレン：0、0.2、0.7、2.0 ppm、パラジクロロベンゼン：0、0.04、0.12、0.4 ppm）でのトキシコゲノミクスの為の 2 時間マウス単回吸入暴露実験（4 用量、16 群構成、各群 3 匹）を実施した。加えて、キシレン（0、2.0 ppm）（2.0 ppm は指針値の 10 倍濃度）について、成熟期および幼若期マウスにおける情動認知行動解析の為の 22 時間/日×7 日間反復吸入暴露実験（2 用量、6 群構成、各群 8 匹）を実施した。いずれの場合も、目標濃度に対し 96.5～111%の濃度で暴露できた。

平成 27 年度はホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）及びアセトアルデヒド（指針値：0.03 ppm）について目標通りに極低濃度下（ホルムアルデヒド：0、0.1、0.3 及び 1.0 ppm、アセトアルデヒド：0、0.03、0.10 及び 0.3 ppm）でのトキシコゲノミクスの為の 2 時間マウス単回吸入暴露実験（4 用量、16 群構成、各群 3 匹）を実施した。加えて、ホルムアルデヒド（0、1.0 ppm）（1.0 ppm は指針値の 10 倍濃度）について、成熟期および幼若期マウスにおける情動認知行動解析の為の 22 時間/日×7 日間反復吸入暴露実験（2 用量、6 群構成、各群 8 匹）を実施した。ホルムアルデヒドの幼若期暴露の場合は 86.5%となったが、他はいずれの場合も、目標濃度に対し 96.6～105%の濃度で暴露できた。

平成 28 年度はテトラデカン（指針値：0.04 ppm）について目標通りに極低濃度下（0、0.04、0.12 及び 0.40 ppm）でのトキシコゲノミクスの為の 2 時間マウス単回吸入暴露実験（4 用量、16 群構成、各群 3 匹）を実施した。また、ホルムアルデヒド（指針値：0.08 ppm）について、目標通りに極低濃度下（0、1 ppm）での IL-1 の経時的な血中濃度測定のために、22 時間/日×7 日間反復暴露（2 用量、8 群構成、各群 4 匹）を実施した。加えて、ホルムアルデヒドについて、目標通りに極低濃度下（0、1 ppm）での幼若期暴露方法の再検討に向けた離乳後（4 週齢）の個別飼育による情動認知行動解析の為の 22 時間/日×7 日間反復吸入暴露実験（2 用量、2 群構成、各群 8 匹）を実施した。テトラデカンについては、98.8～102.5%の濃度で暴露でき、ホルムアルデヒドについては、目標濃度に対し 97.5～118.4%の濃度で暴露できた。

このようにいずれの場合もほぼ目標暴露濃度（96.5～118.4%）にて、マウスに安定して吸入暴露することができた。さらに、IL-1 の経時的な（4 時点）血中濃度測定を実施したところ、対照群においても検出限界（1.03 pg/mL）以下であったため、今後、より高感度な測定を検討予定である。

A . 研究目的

実験動物による吸入毒性試験において病理組織学的な病変を誘発する暴露濃度は、人のシックハウス症候群（SH）の指針濃度をはるかに超える濃度であることから、毒性試験から得た情報を人へ外挿することの困難さが指摘されてきた。これに対し、先行研究では平成14年「厚生労働省シックハウス問題に関する検討会」が掲げる物質をその指針値レベルでマウスに反復吸入暴露（7日間）し、病理組織所見が得られない段階での遺伝子発現変動を Percellome トキシコゲノミクス法により測定し、肺、肝において化学物質固有及び共通のプロファイルを網羅的に捕えた。加えて、海馬に対し化学構造の異なる3物質が共通して神経活動抑制を示唆する遺伝子発現変化を誘発したことから、人のSHにおける「不定愁訴」の原因解明の手がかりとなる可能性が示された。

本研究は、反復暴露の結果の検証とその判定根拠の一般化を目指し、同一個体の海馬、肺、肝の遺伝子発現変動を解析し海馬神経活動抑制の上流に位置する分子機序と肺・肝の関与の解明、情動認知行動解析と海馬における神経科学的物証の収集による中枢に対する有害性の実証データと、遺伝子発現変動データの突合による、遺伝子発現情報からの中枢影響に関する予見性の確認、を目的とする。この際、脳が高感受性期にある子どもの特性に配慮した幼児期暴露 - 遅発性影響も検討する。

本分担研究では、雄性マウスを対象とした極低濃度吸入暴露実験を、第一の目的に向けて、先行研究での暴露条件である2時間単回暴露のプロトコールにより、また第二の目的に向けて、先行研究での暴露条件である22時間/日×7日間反復暴露のプロトコールにより実施する。

B . 研究方法

B-1：被験物質

B-1-1: テトラデカン（平成28年度実施）

テトラデカン(tetradecane; 分子量198.4、CAS No. 629-59-4、和光純薬工業)も先行研究と同じものを使用した。

製造元：和光純薬工業株式会社

試薬名：テトラデカン

カタログ番号：207-10705

ロット番号：DSP1989

純度：99.6%（和光純薬工業(株)測定値）

沸点：253.7

蒸気圧：1.33hPa（76.4℃）

比重：0.763

使用した被験物質の特性は、GC/MS（日立製作所 M-80B）を用いて定性した。その結果、テトラデカンに相当するイオンピークを確認した（図1）。

B-1-2: アセトアルデヒド（平成28年度実施）

アセトアルデヒド（Acetaldehyde; 分子量：44.05、CAS No.：75-07-0）は、下記の試薬を使用した。

B-1-2-1 アセトアルデヒド原液

製造元：シグマ - アルドリッチ

試薬名：アセトアルデヒド

カタログ番号：00071

ロット番号：STBD7279V

純度：99.9%

B-1-2-2 アセトアルデヒド標準ガス

製造元：高千穂化学工業株式会社

試薬名：アセトアルデヒド標準ガス

容器番号：CQB13320

ボンベ濃度：50.6ppm

標準ガス製造：B-1-2-1のアセトアルデヒド原液を用いて製造された。

容器種類、材質：47L（アルミニウム）

充填量：11.8Mpa

使用した被験物質の特性は、GC/MS（日立製作

所 M-80B)を用いて定性した。その結果、アセトアルデヒドに相当するイオンピークを確認した(図2)。

B-1-3:ホルムアルデヒド(平成28年度実施)
ホルムアルデヒド(Formaldehyde;分子量:30.03、CAS No.:50-00-0)は、下記の試薬を使用した。

製造元:和光純薬工業株式会社

試薬名:ホルムアルデヒド液

カタログ番号:064-00406

ロット番号:ECR1935

沸点:-19.2

蒸気圧:1.33 kPa(10mmHg)(-88)

比重:0.815

B-2:吸入暴露システム

B-2-1:テトラデカンの吸入暴露システム

B-2-1-1:トキシコゲノミクスのための2時間単回吸入暴露実験:

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

12週齢の雄性C57BL/6Jマウス(日本チャールスリバー)(4用量、16群構成、各群3匹)を用いて、テトラデカン(指針値:0.04 ppm)についてSHレベル(0、0.04、0.12及び0.40 ppm)での2時間単回吸入暴露実験を実施した。吸入装置のシステムを図3に示した。被験物質供給装置(柴田科学(株)特注)の発生容器内のテトラデカンを循環式恒温槽で加熱(24)しながら、清浄空気のバブリングにより蒸発させた。この蒸気を清浄空気(キャリア空気)と混合しながら、循環式恒温槽で一定温度に冷却(18)再加熱し(25)一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給した。ラインミキサー上で新鮮空気と混合し、設定濃度としたテトラデカンを吸入チャンバーに送り込んだ。

なお、新鮮空気はHEPAフィルターと活性炭フィルターにより濾過して使用した。

吸入チャンバーは全身暴露型であり、上部と下部が角錐状の角型チャンバーで観察窓の部分がガラス製、その他の部分はステンレス製である。容量は各吸入チャンバーとも1,060 Lである。チャンバー内の空気の流れを均一化するために、吸入チャンバー上部の角錐部と角型部の間に、多孔板を設置した。吸入チャンバーは、各群(0.04 ppm暴露群、0.12 ppm暴露群、0.40 ppm暴露群および対照群)につき1台、計4台を用いた。動物を収容する個別飼育ケージは吸入チャンバーの角型部の同一平面上に設置した。飼育ケージは全面がステンレス製の金網であり、5連ケージ(1匹当りのスペースが100(W)×116(D)×120(H)mm)を使用した。ケージには蓋付のえさ箱、および動物の飲水のための自動給水ノズルを設置した。また、吸入チャンバー下部の角錐部には動物の糞尿を除去するための自動洗浄装置を設置した。

B-2-2:アセトアルデヒドの吸入暴露システム

B-2-2-1:トキシコゲノミクスのための6時間/日×7日間反復吸入暴露実験:

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

12週齢の雄性C57BL/6Jマウス(日本チャールスリバー)(4用量、16群構成、各群3匹)を用いて、アセトアルデヒド(指針値:0.03 ppm)についてSHレベル(アセトアルデヒド:0、0.03、0.10、0.30 ppm)での2時間単回吸入暴露実験を実施した。

吸入暴露装置のシステムを図4に示した。アセトアルデヒド標準ガスをフローコントロールバルブと流量計を用いて圧力と流量を調整し、一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに供給し、実験を行った。

吸入チャンバーは全身暴露型であり、上部と下部が角錐状になった角型のチャンバーで観察

窓の部分がガラス製、その他の部分はステンレス製である。容量は各吸入チャンバーとも1,060 Lである。チャンバー内の空気の流れを均一化するために、吸入チャンバー上部の角錐部と角型部の間に、多孔板を設置した。動物を収容する個別飼育ケージは吸入チャンバーの角型部の同一平面上に設置した。飼育ケージは全面がステンレス製の金網であり、5連ケージ(1匹当りのスペースが100(W)×116(D)×120(H) mm)を使用した。ケージには蓋付のえさ箱、および動物の飲水のための自動給水ノズルを設置した。また、吸入チャンバー下部の角錐部には動物の糞尿を除去するための自動洗浄装置を設置した。

B-2-3: ホルムアルデヒドの吸入暴露システム

B-2-3-1: 情動認知行動解析のための、幼若期暴露方法の再検討に向けた離乳後(4週齢)の個別飼育による22時間/日×7日間反復暴露実験:

この部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施した。

平成26及び27年度の研究では、幼若期([2週齢])暴露を検討し、幼若期マウスは哺乳動物であるため、母マウスと共に群飼育により吸入暴露を実施したが、ホルムアルデヒドの幼若期吸入暴露の際、遅発影響が認められず、この原因として吸入暴露が不十分であった事が考えられ、幼若期暴露方法における課題が残った。すなわち母マウス同居下の群飼育により、ホルムアルデヒドが被毛などに吸着してしまったことが考えられた。そこで、母マウスとの同居が不要で、個別飼育が可能となる条件下、できるだけ若齢である4週齢の雄性マウスを用いた検討(個別飼育)も実施することとした。

4週齢(28日齢)の雄性C57BL/6NCrSlcマウス(日本エスエルシー)(2用量、6群構成、各群8匹)を用いて、ホルムアルデヒド(指針値: 0.08 ppm)についてS Hレベル(0、1.0 ppm)(1.0 ppm

は指針値の約10濃度)での22時間/日×7日間反復暴露を実施した。ホルムアルデヒドガスの発生法は先行研究での検討の結果、もっとも安定して発生する事ができる、バブリングにより発生させる装置(柴田科学、Photo 1)を用いてガスを発生する方法を採用した。発生装置内タンクに入れ25℃に加温したホルムアルデヒド(和光純薬)に清浄空気を送りバブリングによりガスを発生させ、15℃の冷水でガスを冷却、清浄空気により一時希釈し、定量供給するフローコントロールバルブと浮子式流量計を用い、横層流型チャンバー(柴田科学、Photo 1)へ混合・希釈するためのラインミキサー内へ空調(温度:25±2℃、湿度:55±5%)された清浄な換気空気とともに希釈導入し、ステンレス製網ケージ(柴田科学、Photo 2,3)内に収容したマウスに1日あたり22時間(午後12時より午前10時まで)、7日間吸入暴露した。本研究で以後使用するチャンバーは、横層流型(容積3 m³、Photo 1)とし、チャンバー内にサーキュレーター(Photo 2)を設置し強力に空気を攪拌した状態で動物への暴露を行うこととした(Photo 2,3)。

妊娠11日齢のマウスを購入し出生後、1腹につき産児5匹以上8匹未満で雄児マウスが2匹以上含まれる条件の腹を情動認知行動実験に供した。トレイ交換時の騒音などのストレスによる食殺防止の目的で、排泄物を受けるためのトレイ交換を無くすために、トレイ上にパルプ製床敷(パルマスμ)を、床敷と金網ケージが密着するように敷き、更に、金網ケージ内にも敷いた(Photo 4)。

B-2-3-2: IL-1 の経時的な血中濃度測定のための22時間/日×7日間反復暴露実験:

この部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施した。

成熟期(12週齢)の雄性C57BL/6NCrSlcマウス

(日本エスエルシー)(2用量、6群構成、各群8匹)を用いて、ホルムアルデヒド(指針値: 0.08 ppm)についてSHレベル(0、1.0 ppm)(1.0 ppmは指針値の約10濃度)での22時間/日×7日間反復暴露を実施した。ホルムアルデヒドガスの発生法および暴露方法は、上記B-2-3-1の場合と同様である。ただし、先行研究と同様に、成熟期暴露の際は、トレイ上にパルプ製床敷(パルマス μ)を敷かなかった。

B-3: 吸入チャンバー内の濃度測定の方法

B-3-1: テトラデカンの濃度測定の方法

B-3-1-1: トキシコゲノミクスのための2時間単回吸入暴露実験:

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

B-3-1-1-A: 被験物質の捕集方法

サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-100H、柴田科学製)を用い、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管(ORBOTM-91 Tube, Large, SUPELCO製)に吸入チャンバー内の空気を吸引した。サンプリング用ポンプの吸引流量は0.5 L/分とした。捕集時間は暴露時間(暴露開始から暴露停止まで)に合わせ62時間とした。捕集管の暴露1回当たりの使用本数は、対照群は1本、投与群は各濃度とも3本とした。

B-3-1-1-B: 捕集管の前処理及び分析条件

吸入チャンバー内の被験物質濃度は、固相吸着-溶媒抽出法により測定した。すなわち、捕集管の活性炭(1層及び2層)を取り出し、各々、かっ色バイアルビン(日電理化硝子製)に入れ、二硫化炭素(和光純薬工業製、作業環境測定用)2 mLを加え、蓋をしてダイレクトミキサ-(サ-マル化学産業製)を用いて1時間振とうした。0.12 ppm群及び0.40 ppm群の活性炭1層は、検量線の所定の範囲に入るように段階希釈した。その後、バイアルビン(Agilent Technologies社

製 2 mL用バイアルビン)に入れ、蓋をしてガスクロマトグラフ(Agilent Technologies社製 5890A)により測定した。

ガスクロマトグラフの分析条件は、カラムはDB-1(0.53 mm × 30 m)、キャリアーガスはヘリウム、検出器はFIDを用い、カラム温度は180、注入口温度は250、検出器温度は250、試料注入量は1 μ Lとした。

B-3-2: アセトアルデヒドの濃度測定の方法

B-3-2-1: トキシコゲノミクスのための6時間×7日間反復吸入暴露実験:

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

B-3-2-1-A: 被験物質の捕集方法

測定に際しては、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-100H、柴田科学株式会社製)を用いて、動物を収容したケージの上部に設置した捕集管(LpDNPH S10L、カタログ番号: 505361-U、SUPELCO社製)に吸入チャンバー内の空気を吸引した。サンプリング用ポンプの吸引流量は0.5 L/分とした。捕集時間は暴露時間(暴露開始から暴露停止まで)に合わせ2時間とした。

B-3-2-1-B: 捕集管の前処理及び分析条件

アセトアルデヒド濃度は、固相吸着-溶媒抽出法により毎日測定することにより算出した。すなわち、捕集管内の2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応し、アセトアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンとして捕集管内に生成され、そのアセトアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンは、アセトニトリル(HPLC分析用和光純薬工業株式会社)10mLによりメスフラスコに抽出し、濃度に応じて希釈調製し、高速液体クロマトグラフ(HPLC)(LC-10 島津製作所)により分析を実施した。なお、HPLCの分析条件に関して、移動相組成はアセトニトリル:蒸留水

= 60 : 40、流量は1mL/min、カラムはL-column ODS(4.6mm × 150mm、粒径 : 5 μm (財)化学物質評価研究機構)、検出波長はUV260nm、試料注入量は10 μLとした。

また、検量線はアセトアルデヒドの量を換算したアセトアルデヒド 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの標準品アセトアルデヒド-DNPH(カタログ番号 : 4M7340-U スペルコ社)を用い、0.1 ~ 10 μg/mLの範囲で検量線を作成した。

B-3-3: ホルムアルデヒドの濃度測定の方法

B-3-3-1: 情動認知行動解析のための、幼若期暴露方法の再検討に向けた離乳後(4週齢)の個別飼いによる情動認知行動解析のための22時間/日×7日間反復実験 :

被験物質の捕集の部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施し、捕集管の前処理及び分析は、日本バイオアッセイ研究センターに依頼した。

ホルムアルデヒドガスの濃度検知は、チャンパー内濃度について、定流量ポンプ(MP -30、MP -300(柴田科学)、Photo 5)により活性炭捕集管(ORBOTM-91;E-L、SUPELCO社)へチャンパー内空気を通し、捕集管内に充填されている活性炭にホルムアルデヒドガスを吸着させ、溶媒(二硫化炭素)で抽出し、ガスマスを用いてその濃度を測定する、「シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会」が推奨する方法によりおこなった。捕集管内導入流量は、対照群では500mL/分[660L]、1.0ppm暴露群では100mL/分[132.0L]とした。22時間/日×7日間暴露に際し、暴露期間中の2日終了時と7日終了時に、マウスへの22時間暴露中のチャンパー内空気を捕集した捕集管を測定機関(日本バイオアッセイ研究センター)に送付し、分析を依頼した。

B-3-3-2: IL-1 の経時的な血中濃度測定のため

の22時間/日×7日間反復暴露実験 :

被験物質の捕集の部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施し、捕集管の前処理及び分析は、日本バイオアッセイ研究センターに依頼した。

ホルムアルデヒドガスの濃度検知は、上記B-3-3-1の場合と同様である。

B-4 : IL-1 の経時的な血中濃度測定

ホルムアルデヒドについて、SHレベルの22時間/日×7日間反復吸入暴露(2用量[指針値の約10濃度の1 ppm、及び0 ppm]、4時点、各群4匹)の際に、心臓採血により得た血清について、IEGの転写を調節し得る候補分子であるIL-1のELISA法による測定をRayBiotech社に委託し実施した(抗マウスIL-1 抗体はELM-IL1b (RayBiotech社)を使用)。採血の4時点は、22時間/日×7日間反復吸入暴露の際の組織サンプル採取のタイミングと同じく、暴露22、70、166及び190時間後であり、暴露190時間後は、暴露休止24時間後にあたる。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属する研究機関の指針を遵守した。

C . 研究結果及び考察

C-1: トキシコゲノミクスのためのテトラデカン2時間単回及びアセトアルデヒド6時間/日×7日間反復吸入暴露実験の場合 :

この部分は、日本バイオアッセイ研究センターに委託することにより実施した。

C-1-1: テトラデカンの場合

C-1-1-A: テトラデカンの濃度制御の方法の検討

縦層流の1060Lの中型チャンパー(毎分212Lの

送気量)を用いてマウス(CrIj:CD1(ICR)・日本チャールス・リバー(株) 厚木飼育センター・雄6週齢12匹)を平置き均一配置にした状態で、テトラデカンの暴露検討を行った。テトラデカンの発生は、被験物質供給装置(柴田科学(株)特注)の発生容器内のテトラデカンを循環式恒温槽で加熱しながら、清浄空気のバブリングにより蒸発させた。この蒸気を清浄空気(搬送空気)と混合しながら、循環式恒温槽で一定温度に冷却、再加熱し、一定濃度にした後、流量計を用いて一定量を吸入チャンバー上部のラインミキサーに送り込み、新鮮空気と混合し、設定濃度としたテトラデカンを吸入チャンバーに供給した。

チャンバー内濃度の確認は、サンプリング用ポンプとして高負荷型ミニポンプ(MP-100H、柴田科学製)を用い、動物を収容するケージの上部に設置した捕集管(ORBOTM-91 Tube, Large, SUPELCO製)に吸入チャンバー内の空気を吸引した。サンプリング用ポンプの吸引流量は0.5 L/分とした。捕集管の暴露1回当たりの使用本数は、各濃度とも3本とした。捕集管の活性炭(1層及び2層)を取り出し、各々、かっ色バイアルビン(日電理化学硝子製)に入れ、二硫化炭素(和光純薬工業製、作業環境測定用)2 mLを加え、蓋をしてダイレクトミキサー(サマル化学産業製)を用いて1時間振とうした。0.04 ppm群、0.12 ppm群及び0.40 ppm群の活性炭1層は、検量線の所定の範囲に入るように段階希釈した。その後、バイアルビン(Agilent Technologies社製2 mL用バイアルビン)に入れ、蓋をしてガスクロマトグラフ(Agilent Technologies社製5890A)により測定した。ガスクロマトグラフの分析条件は、カラムはDB-1(0.25 mm × 60 m)、キャリアーガスはヘリウム、検出器はFIDを用い、カラム温度は100 (20 / min) 220 (5 min)、注入口温度は200、検出器温度は200、試料注入量は1 µLとした。

その結果、テトラデカンを暴露したチャンバー内のテトラデカンの濃度は、目標吸入暴露濃度0.04、0.12および0.40 ppmの実測濃度は、それぞれ0.046 ± 0.002 ppm、0.127 ± 0.05 ppmおよび0.380 ± 0.015 ppmと目標値に近い値であった。

以上のことから、テトラデカンを低濃度でマウスに正確に暴露でき、低濃度におけるチャンバー内テトラデカンの濃度コントロールが可能であった。

C-1-1-B: 吸入チャンバー内のテトラデカンの

濃度測定

目標吸入暴露濃度0.04、0.12及び0.40 ppmで、2時間の暴露を行い、被験物質の捕集方法および捕集管の前処理及び分析条件を検討した。なお、捕集管への採気時間は、暴露全時間にわたる2時間とした。

具体的には、2時間の暴露運転で目標吸入暴露濃度0.04、0.12及び0.40 ppmの吸入チャンバーの実測値(以下、平均値 ± 標準偏差)がそれぞれ0.0395 ± 0.0008 ppm(目標濃度に対し98.8%)、0.123 ± 0.004 ppm(目標濃度に対し102.5%)および0.392 ± 0.014 ppm(目標濃度に対し98.0%)になり、各濃度群とも目標濃度に近似した値が得られた(図6A)。

従って、テトラデカンの室内濃度指針値である0.04 ppmを考慮した0.04、0.12及び0.40 ppmを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できた。

C-1-2: アセトアルデヒドの場合

C-1-2-A: アセトアルデヒドの濃度制御の方法の検討

発生方法については、アセトアルデヒド(99%、MERCK) 0.3%希釈液を容れたバブリングによる発生装置タンク内のガス濃度が100 ppm以上を示したことから、希釈倍率を0.1%に上げたが、100 ppm以上の濃度であった。この結果からアセトアルデヒドはホルムアルデヒドと異なり揮発性が高く、希釈倍率を上げてアセトアルデヒドガス濃度を低下させることができないことが考えられた。バブリング法では低濃度が得られないため、標準ガスポンペを用いる方法を採用することとし、ガスの供給システムを変更、ガスポンペ用のマスフローコントローラー及び流量計を新たに設置、ポンペガスを希釈することで所定の濃度の暴露が可能となった。高千穂商事から購入した標準ガス濃度は104 ppmであった。このガスをチャンバー内の総換気空気650 L/分により希釈した。0.3 ppm濃度を目標に標準ガス1.9 L/分をチャンバー内に送気、高感度ホルムアルデヒドガスモニター(理研計器)による濃度測定を試みた。高濃度群のモニター値は0.091 ± 0.011 ppm(平均値 ± 標準偏差)を示した。

2 回目に行った濃度測定試験では、設定濃度 0.3 ppm に対し標準ガスを 1.87 L/分で流した高濃度群の捕集管(GL-Pak mini AERO DNPH, ジーエルサイエンス)測定による濃度は 0.237 ppm と 21.2%低く、設定濃度 0.03 ppm に対し標準ガスを 0.19 L/分で流した低濃度群の捕集管測定による濃度は 0.027 ppm と 8.3%低く、設定濃度 0.1 ppm に対し標準ガスを 0.63 L/分で流した中間濃度群は 0.094 ppm と 6%低かった。高濃度群のモニター値は 0.126 ± 0.009 ppm (平均値 \pm 標準偏差) と捕集管測定値 0.237 ppm との濃度差が大きかった。

3 回目の濃度測定時において 2.37 L/分に増やして流した高濃度群の捕集管測定による濃度は 0.286 ppm と 4.7%低く、設定濃度 0.03 ppm に対し標準ガスを 0.21 L/分で流した低濃度群の捕集管測定による濃度は 0.026 ppm と 13.3%低く、設定濃度 0.1 ppm に対し標準ガスを 0.67 L/分で流した中間濃度群は 0.089 ppm と 11%低かった。チャンパー内濃度の安定性を高感度ホルムアルデヒドガスモニターで測定したところ 0.185 ± 0.018 ppm (平均値 \pm 標準偏差) であり、捕集管値 0.286 ppm との濃度差が大きかった。

4 回目の濃度測定試験では、設定濃度 0.3 ppm に対し標準ガスを 2.5 L/分で流した高濃度群の捕集管測定による濃度は 0.323 ppm と 7.2%高く、設定濃度 0.03 ppm に対し標準ガスを 0.25 L/分で流した低濃度群の捕集管測定による濃度は 0.033 ppm と 8.3%高く、設定濃度 0.1 ppm に対し標準ガスを 0.76 L/分で流した中間濃度群は 0.106 ppm と 6%項かった。高濃度群のモニター値は 0.093 ± 0.019 ppm (平均値 \pm 標準偏差) であり、捕集管値 0.323 ppm との濃度差が大きかった。4 回行った高感度ホルムアルデヒドガスモニターの測定結果は、安定性を確認するには使用が可能であるような数値の推移を示すが、捕集管値と比べかなり低い濃度を示していた。本機器は、アセトアルデヒドに対し反応性が悪く信頼性は低いと考えられた。

本試験において 4 回目の濃度試験データを基に、0.03 ppm では 0.23 L/分、0.1 ppm では 0.72 L/分、0.3 ppm では 2.33 L/分に流量を補正し標準ガスを流入させ、得られた捕集管測定濃度は 0.028、0.094、0.277 ppm であり、6.5~8.7%ほど低いが目標値に近い一定濃度を安定的に保持し、動物に曝露することができた。また対照群チャンパー内濃度は 0.0020 ± 0.0013 ppm (3.75 ± 2.19 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均値 \pm 標準偏差)、室内濃度は 0.0040 ± 0.0024 ppm (6.83 ± 4.49 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、平均値 \pm 標

準偏差)と低濃度群の 0.028 ppm と比し低い濃度であり、一般環境大気濃度 0.23~7.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均値 2.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) (環境省、2003) と動物室内は同等であり、一般家庭の室内空気中で検出される平均濃度 17 ppb (国土交通省、2003) を下回り、実験に影響はないものと考えられた。

C-1-2-B: 吸入チャンパー内のアセトアルデヒドの濃度測定

目標吸入曝露濃度 0.03、0.10 及び 0.30 ppm で、2 時間の曝露を行い、被験物質の捕集方法および捕集管の前処理及び分析条件を検討した。なお、捕集管への採気時間は、曝露全時間にわたる 2 時間とした。

具体的には、2 時間の曝露運転で目標吸入曝露濃度 0.03、0.10 及び 0.30 ppm の吸入チャンパーの平均値 \pm 標準偏差がそれぞれ 0.0306 ± 0.0010 ppm (目標濃度に対し 102.0%)、 0.102 ± 0.002 ppm (目標濃度に対し 102.0%) 及び 0.303 ± 0.004 ppm (目標濃度に対し 101.0%) になり、各濃度群とも目標濃度に近似した値が得られた(図 6B)。

従って、アセトアルデヒドの室内濃度指針値である 0.03 ppm を考慮した 0.03、0.10 および 0.30 ppm を目標曝露濃度とした吸入曝露が達成できた。

C-2: ホルムアルデヒド 22 時間/日 \times 7 日間反復吸入曝露実験の場合:

この部分は、国立医薬品食品衛生研究所・毒性部において実施した。

情動認知行動解析のための、幼若期曝露方法の再検討に向けた離乳後(4 週齢)の個別飼いにによる反復曝露する場合と、IL-1 の経時的な血中濃度測定のための成熟期マウスを対象とした反復曝露をする場合の 2 種類の実験を実施した。

先行研究での検討結果を踏まえて、発生流量を 1.0 L/分とし、供給流量はチャンパー内のホルムアルデヒド濃度測定結果を考慮しつつ調整し、目標濃度 1.0 ppm に対して 4.6~4.8 L/分とし、一次希釈流量 10 L/分及びチャンパー換気流量

650 L/分で希釈し暴露した。目標吸入暴露濃度 1.0 ppmの吸入チャンバーの実測値(以下、平均値±標準偏差、最小～最大値)は、離乳後(4週齢)の個別飼いによる暴露の場合は、 1.18 ± 0.08 ppm (1.01～1.29 ppm)、IL-1 の経時的な血中濃度測定のために暴露した場合は、 0.98 ± 0.07 ppm (0.89～1.08 ppm)と、目標濃度に対しそれぞれ118.4%、97.5%となり、ほぼ目標濃度が得られた。従って、加熱パブリック法によって、ホルムアルデヒドの室内濃度指針値である0.08 ppmを考慮した1.0 ppmを目標暴露濃度とした吸入暴露が達成できた(図6C)。また対照群チャンバー内にホルムアルデヒドは検出されなかった。

・(環境省、2003)

環境省環境保健部環境安全課「平成 14 年度地方公共団体等における有害大気汚染物質のモニタリング調査結果(表7)」(2003)
http://www.env.go.jp/air/osen/monitoring/mon_h14/hyo_07.html

・(国土交通省、2003)

国土交通省住宅局住宅生産課「平成 14 年度室内空气中の化学物質の実態調査の結果について(2003)
http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha03/07/071219_.html

C-3: IL-1 の経時的な血中濃度測定

S Hレベルの吸入暴露期間中の、IEGの転写を調節し得る候補分子であるIL-1 の血液中濃度測定を検討する為に、ホルムアルデヒドについて極低濃度下(0, 1 ppm)、22時間/日×7日間反復暴露(2用量、8群、各群4匹)の際に、経時的(4時点)に心臓採血により得た血清について、ELISA法による測定したところ、対照群、暴露群共に全てのサンプルについて、現行法では検出限界(1.03 pg/mL)以下の濃度であったため、今後、より感度のよい測定法を検討する。

D. 結論

平成28年度(今年度)は、トキシコゲノミクスのための吸入暴露実験に向け、テトラデカン(指針値:0.04 ppm)についてS Hレベル(0, 0.04, 0.12及び0.40 ppm)での2時間単回吸入暴露を、アセトアルデヒド(指針値:0.03 ppm)についてS Hレベル(0, 0.03, 0.10, 0.30 ppm)での6時間/日×7日間反復暴露を実施し、また情動認知行動解析の為に吸入暴露実験に向け、ホルムアルデヒド(0, 1.0 ppm: 1.0 ppmは指針値の約10濃度)について、幼若期暴露方法の再検討に向けた離乳後(4週齢)の個別飼いによるS Hレベルでの22時間/日×7日間反復暴露を実施した。加えて、IEGの転写を調節し得る候補分子IL-1 の経時的な血中濃度測定のための、ホルムアルデヒドについてS Hレベル(0及び1 ppm)での成熟期マウスを対象とした7日間反復吸入暴露を実施した。その結果、トキシコゲノミクスのための吸入暴露実験において、テトラデカンの目標暴露濃度(0, 0.04, 0.12及び0.40 ppm)に対して、それぞれ0.040, 0.123及び0.392 ppm、アセトアルデヒドの目標暴露濃度(0.03, 0.10及び0.30 ppm)に対して、それぞれ0.031, 0.102及び0.303 ppm、他方、情動認知行動解析のための吸入暴露実験においては、ホルムアルデヒドの目標暴露濃度(1.0ppm)に対して、幼若期暴露方法の再検討に向けた離乳後(4週齢)の個別飼いによる22時間/日×7日間反復暴露では1.184 ppm、IL-1 の経時的な血中濃度測定のための22時間/日×7日間反復暴露では0.975 ppmと、それぞれほぼ目標暴露濃度にて、マウスに安定して吸入暴露することができた。

さらに、IL-1 の経時的な(4時点)血中濃度測定を実施したところ、対照群においても検出限界(1.03 pg/mL)以下であったため、今後、より高感度な測定を検討予定である。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, deta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J. Learning and memory deficits in male adult mice treated with a benzodiazepine sleep-inducing drug during the juvenile period. Front Neurosci 10: 339- ,2016.

2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral exposure data for prediction of lung toxicity.

第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.29)

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement. 14th International Congress of Toxicology 2016 (ICT 2016) (2016.10.3), Merida, Mexico

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Project の進捗 - 単回および新型反復曝露の比較による予測性向上 -

第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.7.1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study.

The 52nd Congress of EUROTOX (EUROTOX2016) (2016.9.6), Seville, Spain.

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純

キシレンの経気道吸入曝露によるマウス行動影響解析

第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.30)

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純

キシレン吸入曝露によるマウスへの中枢機能影響解析

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

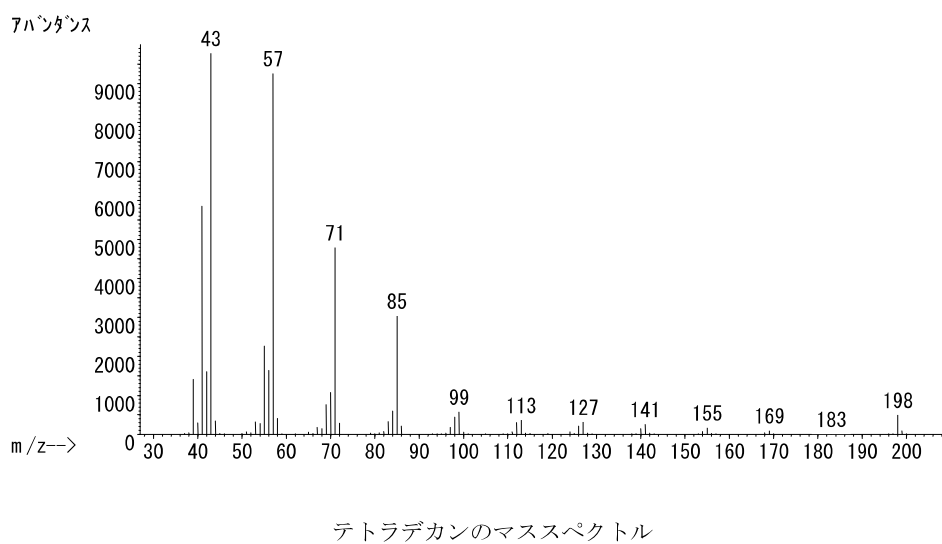
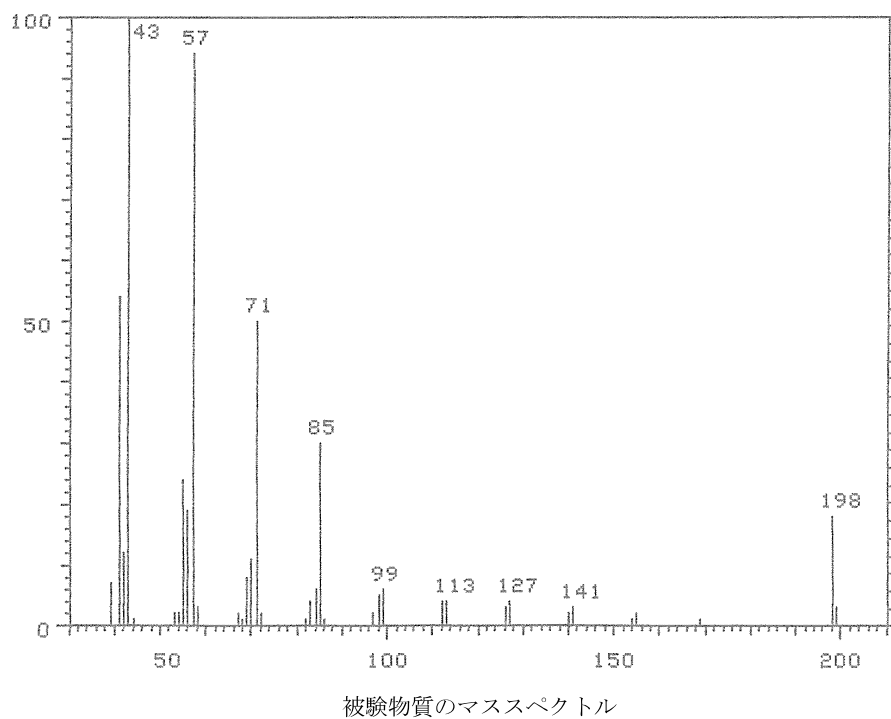
なし

表 1 吸入チャンバー内のテトラデカンの被験物質濃度（2時間/日、単回暴露）

	単位：ppm			
	対照群	0.04 ppm群	0.12 ppm群	0.40 ppm群
平均濃度	0	0.0395	0.123	0.392
標準偏差	0	0.0008	0.004	0.014

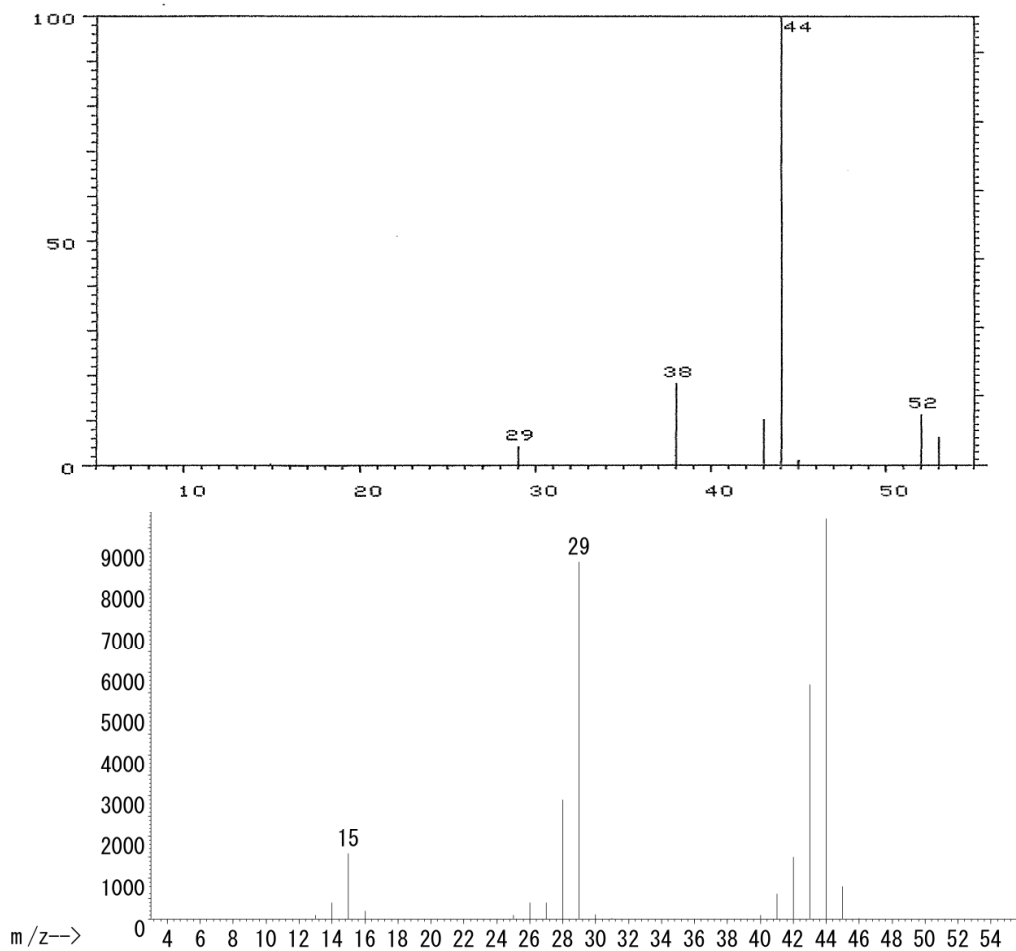
表 2 吸入チャンバー内のアセトアルデヒド濃度（6時間暴露）

	単位：ppm			
	対照群	0.03 ppm群	0.10 ppm群	0.30 ppm群
7月5日午後0時から午後6時	0	0.0318	0.107	0.309
7月6日午後0時から午後6時	0	0.0315	0.104	0.305
7月7日午後0時から午後6時	0	0.0309	0.102	0.304
7月8日午後0時から午後6時	0	0.0306	0.102	0.303
7月9日午後0時から午後6時	0	0.0290	0.100	0.299
7月10日午後0時から午後6時	0	0.0296	0.101	0.300
7月11日午後0時から午後6時	0	0.0305	0.101	0.298
平均濃度	0	0.0306	0.102	0.303
標準偏差	0	0.001	0.002	0.004



McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data.
6th ed. New York, NY:John Wiley and Sons.

図1 テトラデカンのマススペクトル



アセトアルデヒドのマスペクトル
 McLafferty FW, ed. 1994. Wiley Registry of Mass Spectral Data.
 6th ed. New York, NY:John Wiley and Sons.

図2 アセトアルデヒドのマスペクトル

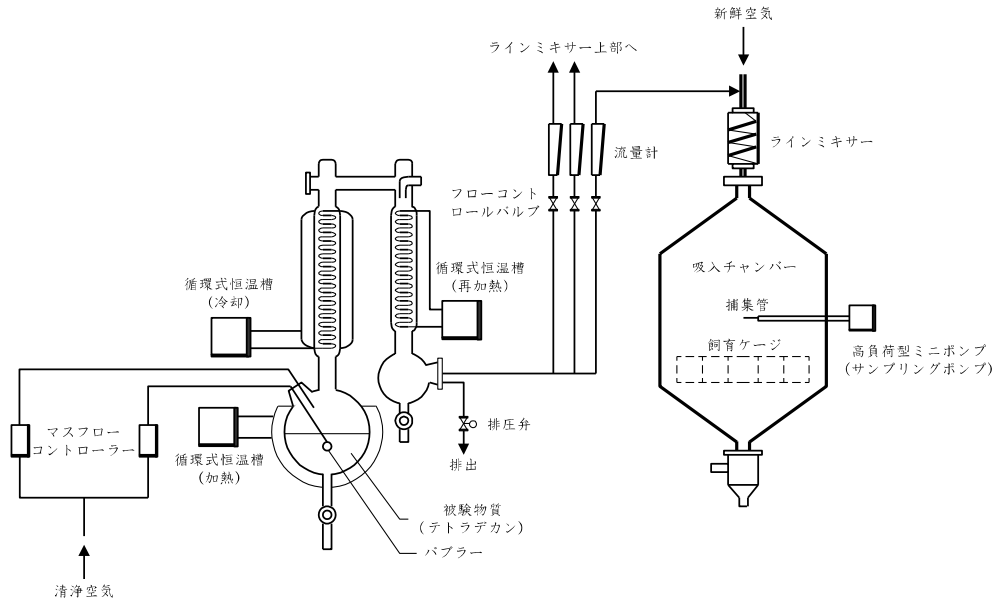


図3 吸入暴露装置のシステム(テトラデカン)

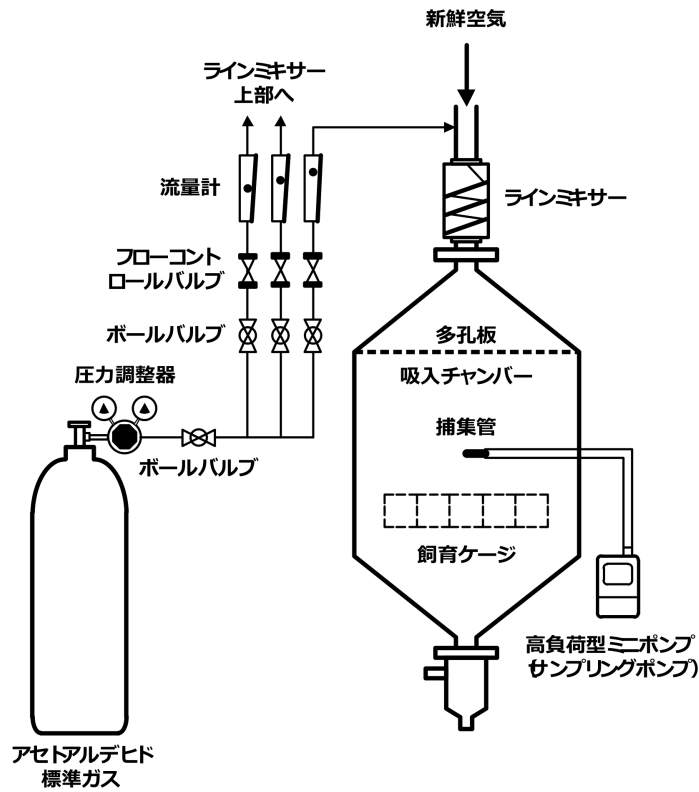


図4 吸入暴露装置のシステム(アセトアルデヒド)



Photo 1 3m³横層流大型チャンバー及びその発生装置(柴田科学)



Photo 2 チャンバー内空気攪拌用サーキュレーター(ボルネード)、及び暴露ケージ(柴田科学)を載せた架台



Photo 3 マウスを暴露ケージ(柴田科学)に収容した状態



Photo 4 トレイ上にパルプ製床敷(パルマス μ)を敷き、暴露ケージに密着させ、金網ケージ内にも床敷を敷いた状態。

